

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**PROMJENE SADRŽAJA KAROTENOIDA I UKUPNE
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ZRNA KUKURUZA
U ZIMSKIM ROKOVIMA BERBE**

DIPLOMSKI RAD

Ivan Fureš

Zagreb, srpanj, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Hranidba životinja i hrana

**PROMJENE SADRŽAJA KAROTENOIDA I UKUPNE
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ZRNA KUKURUZA
U ZIMSKIM ROKOVIMA BERBE**

DIPLOMSKI RAD

Ivan Fureš

Mentor: doc.dr.sc. Kristina Kljak

Zagreb, srpanj, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Ivan Fureš**, JMBAG 0178083781, rođen 31.10.1991. u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

**PROMJENE SADRŽAJA KAROTENOIDA I UKUPNE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ZRNA
KUKURUZA U ZIMSKIM ROKOVIMA BERBE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Ivan Fureš**, JMBAG 0178083781, naslova

PROMJENE SADRŽAJA KAROTENOIDA I UKUPNE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ZRNA
KUKURUZA U ZIMSKIM ROKOVIMA BERBE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | |
|----|-----------------------------|--------|
| 1. | doc.dr.sc. Kristina Kljak | mentor |
| 2. | prof.dr.sc. Darko Grbeša | član |
| 3. | prof.dr.sc. Zlatko Svečnjak | član |

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Kljak na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izvođenju analiza i izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i članovima povjerenstva prof.dr.sc. Darku Grbeši i prof.dr.sc. Zlatku Svečnjaku na stručnoj i tehničkoj pomoći.

Djelatnicima laboratorija Zavoda za hranidbu životinja zahvaljujem se na ustupljenom prostoru i pomoći pri provođenju analiza.

Hvala mojim prijateljima i djevojci što su sa mnom prolazili kroz ispite i bili mi podrška tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima i bratu koji su me pratili kroz cijelo moje školovanje.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Karotenoidi	3
2.2. Zrno kukuruza i karotenoidi	4
2.2.1. Građa zrno kukuruza	4
2.2.2. Svojstva zrna kukuruza	5
2.2.3. Karotenoidi zrna kukuruza	5
2.3. Antioksidansi.....	7
2.3.1. Oksidacija i antioksidacijsko djelovanje	7
2.3.2. Antioksidacijska aktivnost zrna kukuruza	9
2.3.3. Antioksidacijska aktivnost karotenoida	10
2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti	12
2.5. Zimski rokovi berbe kukuruza	14
3. Materijali i metode.....	15
3.1. Hibridi kukuruza	15
3.2. Lokacija i vremenske prilike	17
3.3. Uzorkovanje	19
3.4. Kemijske analize	19
3.4.1. Određivanje vlage uzorka	19
3.4.2. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna kukuruza	19
3.4.3. Određivanje sadržaja karotenoida	20
3.5. Statistička obrada podataka	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Ukupni sadržaj karotenoida	22
4.2. Antioksidacijska aktivnost zrna kukuruza	25
5. Zaključak.....	28
6. Popis literature.....	29

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Ivan Fureš**, naslova

PROMJENE SADRŽAJA KAROTENOIDA I UKUPNE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ZRNA KUKURUZA U ZIMSKIM ROKOVIMA BERBE

Zbog nepovoljnih vremenskih uvjeta tijekom uobičajenog razdoblja berbe, kukuruz se ostavlja na polju te bere tijekom zimskih mjeseci. Međutim, prezimljavanje može negativno utjecati na kvalitetu zrna. Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj roka zimske berbe na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna četiri Bc hibrida kukuruza (Bc 344, Bc 353, Bc 572 i Pajdaš). Zrno kukuruza istraživanih hibrida proizvedeno je na istom testnom polju u uvjetima intenzivne agrotehnike, a berba je provedena u listopadu 2015., uobičajenom roku berbe, te siječnju i ožujku 2016., tri i pet mjeseci nakon uobičajene berbe. Ukupni karotenoidi iz zrna su estrahirani heksanom i kvantificirani kao ekvivalent β -karotena spektrofotometrijskom metodom dok je antioksidacijska aktivnost cijelog zrna ispitana direktnom TEAC (*eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metodom. Istraživani hibridi (Bc 344, Bc 353, Bc 572 i Pajdaš; $P < 0,001$) razlikovali su se u sadržaju karotenoida (23,67, 20,83, 23,07 i 24,00 $\mu\text{g/g}$) i antioksidacijskoj aktivnosti (14,59, 14,83, 15,36 i 15,09 mmol/kg). Nadalje, tijekom prezimljavanja opadao je sadržaj karotenoida (s 25,03 u uobičajenom roku berbe na 22,19 i 21,53 $\mu\text{g/g}$ tri i pet mjeseci nakon) što upućuje na trošenje karotenoida u zaštiti zrna. Iako je u drugom roku berbe došlo do pada antioksidacijske aktivnosti (s 14,61 na 14,49 mmol/kg), u trećem roku ona raste (15,81 mmol/kg) što je najvjerojatnije rezultat otpuštanja vezanih fenola kao posljedica obrane zrna od mikroorganizama. Unatoč utvrđenom negativnom djelovanju prezimljavanja na sadržaj karotenoida i antioksidacijsku aktivnost, do većeg negativnog učinka nije došlo zbog blage zime tijekom promatranog razdoblja.

Ključne riječi: kukuruz, karotenoidi, antioksidacijska aktivnost, rok berbe

Summary

Of the master's thesis - student **Ivan Fureš**, entitled

CHANGES OF CAROTENOID CONTENTS AND TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MAIZE GRAIN IN WINTER HARVESTING PERIOD

Adverse weather conditions during usual harvest period can cause leaving maize crops on field and harvesting during winter months. However, overwintering could have a negative effect on grain quality. The aim of this study was to investigate the effect of the winter harvest period on carotenoid content and total antioxidant activity of four grains of Bc hybrids of maize (Bc 344, Bc 353, Bc 572 and Pajdaš). Maize hybrid grains were produced in the same conditions on test field and harvested in October 2015, the usual harvest period, and in January and March 2016, three and five months after the usual harvest period. Total grain carotenoids were extracted with hexane and quantified as equivalents of β -carotene using spectrophotometric method while antioxidant activity of whole grains was tested using a direct TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) method. Tested hybrids (Bc 344, Bc 353, Bc 572 and Pajdaš; $P < 0,001$) differentiated in carotenoid content (23,67, 20,83, 23,07 and 24,00 $\mu\text{g/g}$) and antioxidant activity (14,59, 14,83, 15,36 and 15,09 mmol/kg). Furthermore, carotenoid content decreased during overwintering period (from 25,03 in usual harvest period to 22,19 and 21,53 $\mu\text{g/g}$ three and five months after) which implies carotenoid deterioration in grain protection. Although antioxidant activity decreased in second harvest period (from 14,61 to 14,49 mmol/kg), it increased in third harvest period (15,81 mmol/kg) which is most likely result of the release of bound phenolics during protection from microorganisms. Despite determined negative effect of overwintering on carotenoid content and antioxidant activity, more adverse impact did not occur because of mild winter during observed period.

Key words: maize, carotenoids, antioxidant activity, harvest period

1. Uvod

Kukuruz (*Zea mays* L.) je biljka iz porodice trava (*Gramineae*), red *Maydeae* (*Tripsaceae*) podrijetlom iz Sjeverne Amerike (Oaxaca, Mexico). U Europu ga je 1493. godine donio Columbo (Babić i sur., 2012), a 1572. godine pomorskim putem iz Italije stigao je na područje današnje Hrvatske (Radić i sur., 1872; citirano prema Babić i sur., 2012). Danas se uzgaja u cijelom svijetu, te uz pšenicu (*Triticum* spp.) i rižu (*Oryza sativa*) predstavlja jednu od najvažnijih ratarskih kultura (FAO, 2016). Selekcijom su stvoreni mnogobrojni hibridi različitih podvrsta ili tipova kukuruza koji imaju raznoliku mogućnost upotrebe te sposobnost uspijevanja na lošijim tlima i pri lošijim klimatskim uvjetima (Jurišić, 2008). Zbog svoje visoke energetske vrijednosti smatra se standardnim energetskim krmivom u Republici Hrvatskoj sa čijom se energetskom vrijednošću uspoređuju ostale žitarice. Kukuruzno zrno najvrjedniji je izvor energije u formi škroba i ulja, te bojila karotena i ksantofila u odnosu na ostale žitarice (Grbeša, 2008).

Zrno kukuruza jedina je žitarica koja sadrži značajne količine karotenoida, spojeva važne biološke funkcije koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti kukuruza (najvišoj među žitaricama), a iznosi 181,42 μ mol ekvivalenta vitamina C/g uzorka (Adom i Liu, 2002). Karotenoidi, poput α -karotena, β -karotena, γ -karotena i β -kriptoksantina, su prekursori vitamina A i u tijelu se pretvaraju u vitamin A (Harjes i sur., 2008). Osim aktivnosti pro-vitamina A, dokazano je nekoliko bitnih bioloških funkcija karotenoida u ljudskom zdravlju, osobito u smanjenju rizika od degenerativnih bolesti kao što su rak, katarakta, kardiovaskularne bolesti i makularna degeneracija (Fraser i Bramley, 2004). Iako su danas karotenoidi popularni zbog utjecaja na zdravlje ljudi, njihova primarna funkcija u biljkama je zaštita od štetnih čimbenika što kod žitarica obuhvaća oksidacijski stres, zaraza plijesnima i starenje.

Znatno broj ratara, najčešće zbog nepovoljnih vremenskih uvjeta u vrijeme uobičajene berbe, bere kukuruz tijekom zimskih mjeseci što je dodatan stres za biljku. Visoka razina padalina u jesen, blato, poplave, lošija mehanizacija, manjak radne snage te manjak skladišnog prostora neki su od razloga koji dovode do odgode berbe. Praksa koju koriste neki proizvođači je odbacivanje tipične jesenje žetve, ostavljaju kukuruz da se isuši na polju tijekom zime, a žetvu obave u proljeće, kada žetva zrna ne zahtjeva troškove sušenja (Mahoney i sur., 2015). Boravkom na polju tijekom zime usjev je izložen stresnim uvjetima koji mogu nepovoljno utjecati na sadržaj bioaktivnih komponenti, a samim time i na ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna kukuruza. Istraživanja u kojima se ispituje utjecaj zimske berbe na kvalitetu zrna kukuruza su oskudna, a do sada nije istraživano kako utječe na sadržaj karotenoida i antioksidacijsku aktivnost zrna. Upravo iz navedenog razloga, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj datuma zimske berbe na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna četiri Bc hibrida kukuruza.

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Na temelju dosadašnjih istraživanja postavljene su sljedeće hipoteze:

- Istraživani hibridi kukuruza razlikovat će se u sadržaju karotenoida i ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti zrna.
- Istraživani hibridi kukuruza će reagirati na uvijete tijekom prezimljavanja što će rezultirati padom sadržaja karotenoida i ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna s odgodom roka berbe.

Na temelju postavljenih hipoteza ciljevi ovog istraživanja su:

- Odrediti sadržaj karotenoida zrna četiri Bc hibrida kukuruza u tri roka berbe,
- Odrediti ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna četiri Bc hibrida kukuruza u tri roka berbe TEAC metodom,
- Utvrditi utjecaj roka zimske berbe na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna četiri Bc hibrida kukuruza.

2. Pregled literature

2.1. Karotenoidi

Prema Alfieri i sur. (2014) karotenoidi su skupina u mastima topivih antioksidacijskih spojeva prisutnih u biljkama koji su odgovorni za žutu, narančastu i crvenu boju voća, cvijeća i žitarica. Prirodni su biljni pigmenti koji u biljkama imaju ključnu ulogu u membranskoj stabilnosti, rastu i razvoju (Chander i sur., 2008). Također, prekursori su hormona i esencijalni sastojci fotosintetskog aparata u kojem, u stanju smanjene količine svjetlosti, sudjeluju u prikupljanju svjetlosne energije koju prenose na klorofil gdje se koristi u fotosintezi (Howitt i Pogson, 2006). Djelujući kao antioksidansi u fotoprotekciji sprječavaju oštećenje membrane, hvatajući kisik proizašao iz viška svjetlosne energije te uklanjaju slobodne radikale (Loskutova i sur., 2013). Karotenoidi se nakupljaju u svim vrstama plastida, te se nalaze u većini biljnih organa i tkiva (Howitt i Pogson, 2006; Esteban i sur., 2015).

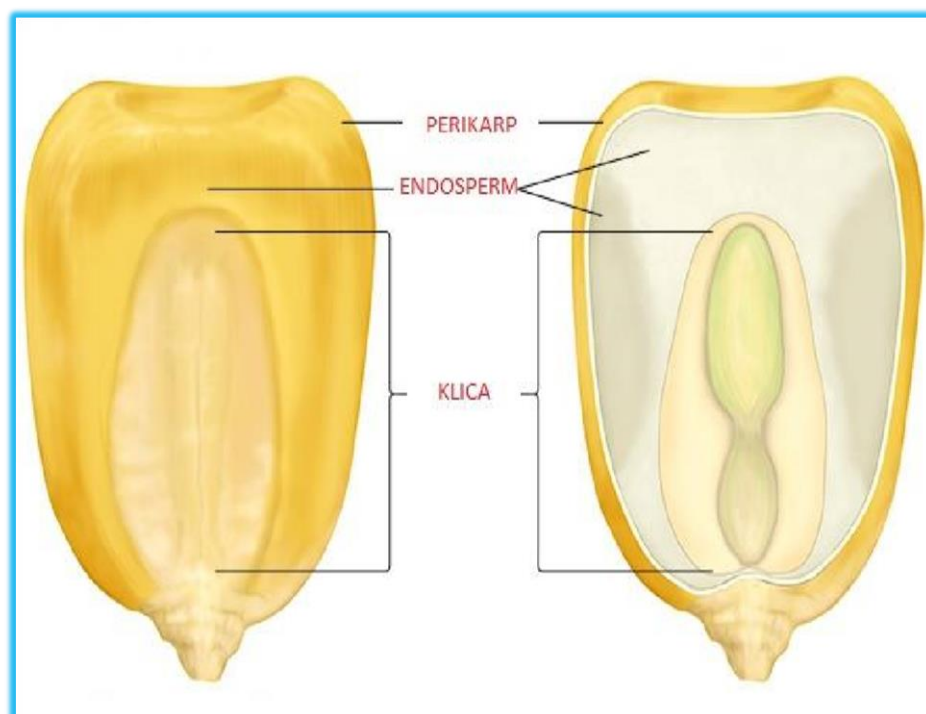
Do sada je identificirano više od 700 prirodnih spojeva koji pripadaju karotenoidima (Howitt i Pogson, 2006). Prema kemijskoj strukturi određena su njihova fizikalno-kemijska svojstva i djelomično biološka aktivnost (Faure i sur., 1999). Strukturno se dijele u dva razreda: neoksisgenirani karotenoidi nazivaju se karotenima, dok su njihovi oksigenirani (sadrže kisik) derivati ksantofili (DellaPenna i Pogson, 2006). U višim biljkama najčešći karoteni su α -karoten, β -karoten, γ -karoten i likopen, dok su najčešći ksantofili β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin.

Životinje i ljudi ne mogu sintetizirati karotenoide, stoga ti spojevi moraju biti integrirani putem hrane biljnog podrijetla. U hranidbi životinja su potrebni kao antioksidansi ili vitamini, ali i za pigmentaciju tkiva i proizvoda. Neki su karotenoidi, uglavnom karoteni te monohidroksi- i monoketokarotenoidi, prekursori vitamina A i u tijelu se pretvaraju u vitamin A (Hencken, 1992). Sintezom α -karotena i γ -karotena nastaje jedna molekula vitamina A, a od β -karotena sintetiziraju se dvije molekule vitamina A (Harjes i sur., 2008). Kod nekih životinja, u uvjetima deficijencije vitamina A čak se i karotenoidi bez pro-vitamin A djelovanja mogu prevesti do vitamina A (Hencken, 1992). U životinja vitamin A ima brojne fiziološke funkcije, a djelovanje mu je povezano i s djelovanjem vitamina E kao antioksidansom, te s vitaminom D u metabolizmu kostiju. Osim aktivnosti pro-vitamina A, dokazano je nekoliko bitnih bioloških funkcija karotenoida u ljudskom zdravlju, osobito u smanjenju rizika od degenerativnih bolesti kao što su rak, katarakt, kardiovaskularne bolesti i makularna degeneracija (Fraser i Bramley, 2004). Wurtzel i sur. (2012) navode da nedostatak ovog vitamina uzrokuje niz poremećaja kao što su smanjeno iskorištavanje željeza, usporavanje rasta, sljepoća, smanjen imuni odgovor, povećana osjetljivost na zarazne bolesti i povećana smrtnost djece.

2.2. Zrno kukuruza i karotenoidi

2.2.1. Građa zrno kukuruza

Kukuruzno zrno, kao što prikazuje Slika 2.2.1.1., sastoji se od endosperma, klice, perikarpa ili omotača i drške zrna. Endosperm je najzastupljeniji dio zrna, s udjelom od 80-85% (Li i sur., 1996), što potvrđuje i Grbeša (2008) navodeći da najveći dio mase zrna ispitivanih 32 Bc hibrida od 83,77% čini endosperm, slijedi klica s 11,35%, pa omotač 5% i drška s manje od 1%. Zrno kukuruza građeno je od caklavog i brašnastog endosperma. Caklavi endosperm obavija cijelo zrno, smješten je ispod košuljice i nalikuje na rožinu. Brašnasti se endosperm nalazi u unutrašnjosti zrna, obavija klicu, mekši je i rahliji te sadrži nešto veće količine škroba u odnosu na caklavi endosperm. Klica se nalazi iznad drška i skladište je hranjiva i hormona za embrio, a vanjski tanki omotač ili košuljica štiti unutrašnjost zrna od mehaničkih i bioloških oštećenja. Svaki dio nositelj je hranjivih tvari, stoga je građa zrna odličan pokazatelj kemijskih i fizikalnih svojstava zrna. Perikarp je bogat vlaknima (90%), endosperm obiluje škrobom (86 – 89%) i proteinima (8%), a klica je bogata lipidima (33%) (Grbeša, 2016).



Slika 2.2.1.1. Građa zrna kukuruza
(Prilagođena slika: <https://www.britannica.com/>)

2.2.2. Svojstva zrna kukuruza

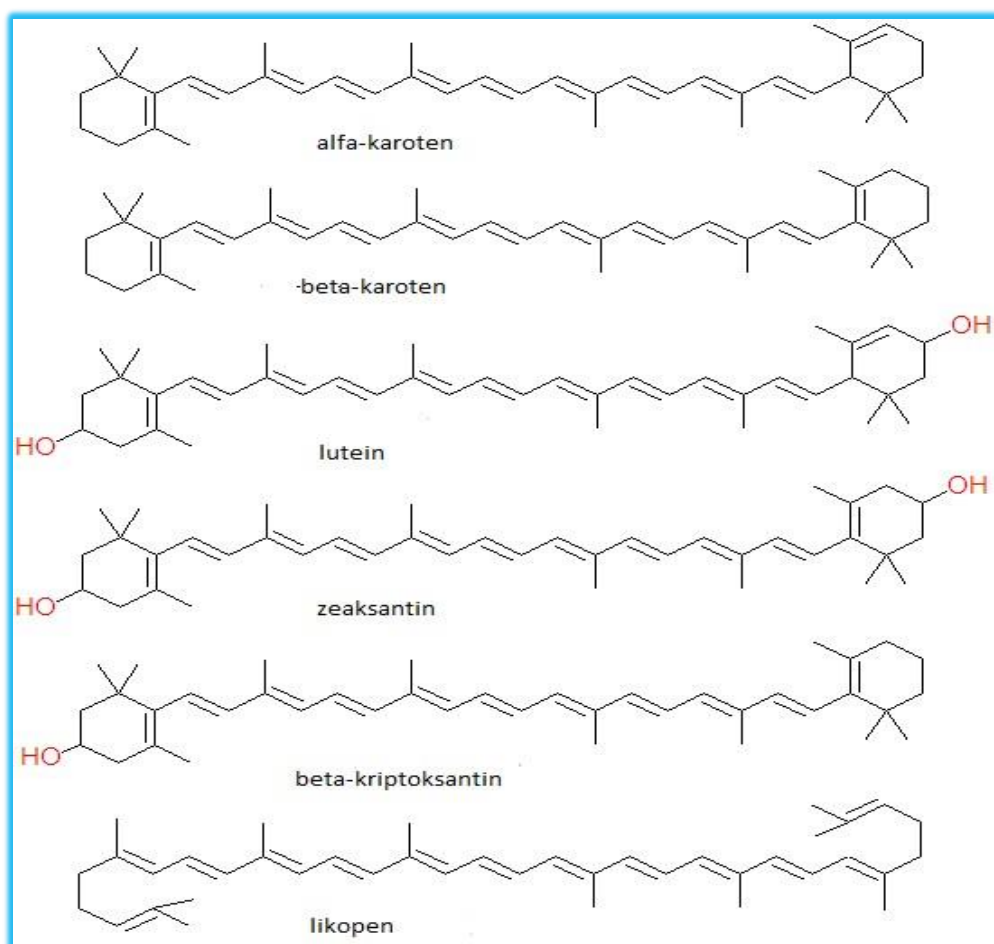
Kukuruz se smatra najkvalitetnijim energetske krmivom za sve vrste životinja. U Republici Hrvatskoj standardno je energetske krmivo sa čijom se energetske vrijednošću uspoređuju ostale žitarice. Ovisno o vrsti životinja, energetske vrijednost zrna kukuruza iznosi od 13-16 MJ/ME po kg. Zrno kukuruza sadrži 60-65% škroba, 4-5% ulja i 2-3% vlakana. Probavljivost organske tvari kukuruza za perad je 87%, za goveda je 89%, a za svinje 91%. U početnoj hrani za mlade životinje kukuruz sudjeluje s 55-60%, a u tovu 60-70%. Kukuruz u ovim količinama na najjeftiniji način podmiruje 60% energetske i do 20% proteinske potreba mladih životinja, 75% energije i 30% proteinske potreba svinja u tovu, te 75-80% energetske i 47% proteinske potreba junadi u tovu (Grbeša, 2008).

Zrno kukuruza ima najvišu antioksidacijsku aktivnost od svih žitarica ($181,42 \pm 0,86$ μmol vitamin C ekvivalenta/g), slijede pšenica ($76,70 \pm 1,38$ μmol vitamin C ekvivalenta/g), zob ($74,67 \pm 1,49$ μmol vitamin C ekvivalenta/g), riža ($55,77 \pm 1,62$ μmol vitamin C ekvivalenta/g) (Adom i Liu, 2002). Od brojnih prirodnih antioksidansa, kukuruz sadrži tokole (vitamin E, 17 mg/kg), feruličnu kiselinu i druge fenolne spojeve, zein, fitinsku kiselinu, te karotenoide (vitamin A ekvivalent - 2324 IU/kg) koji svi zajedno djeluju protiv opasnih slobodnih radikala ili oksidansa (Bacchetti i sur., 2013; Grbeša, 2008). Također, značajan je izvor i vitamina B grupe, osim B12. U Hrvatskoj se najviše uzgaja kukuruz žutog zrna. Žuta ili narančasta boja dolazi od visokog sadržaja karotenoida, odnosno karotena i ksantofila (Grbeša, 2012; de la Parra i sur., 2007). Većina kukuruznog karotenoida nalazi se u endospermu zrna (95–97%), od čega se 74-86% nalazi u caklavom endospermu, a 9–23% u brašnastom (Blessin i sur., 1963), što upućuje da hibridi s većim udjelom caklavog endosperma (tvrdunci) mogu imati veći udio karotenoida u zrnu.

2.2.3. Karotenoidi zrna kukuruza

Zrno kukuruza jedina je žitarica koja na suhoj osnovi sadrži značajne količine karotenoida, s rasponom od 6,53 do 47,47 mg/kg ST (Alfieri i sur., 2014; Kljak i sur., 2009). Tako visoke razlike u sadržaju ukupnih karotenoida uzrokovane su genotipom, koji objašnjava 88-97 % varijacija (Kurilich i Juvik , 1999; Egesel i sur., 2003), dok preostale varijacije između skupina istog kultivara mogu biti posljedica klimatskih, geografskih i uzgojnih razlika (Alfieri i sur., 2014). Karotenoidi koji se obično nalaze u zrnu žutog kukuruza, prikazani na slici 2.2.3.1., su lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin i β -karoten (Weber, 1987; Egesel i sur., 2003), pri čemu udio luteina i zeaksantina može biti nekoliko puta viši od β -kriptoksantina i β -karotena (Kurilich i Juvik, 1999). Navedeno potvrđuju Kljak i Grbeša (2015) u svom istraživanju na Bc hibridima kukuruza navodeći sadržaj luteina u rasponu od 6,41 do

16,04 mg/kg i zeaksantina u rasponu od 8,31 do 18,59 mg/kg gdje su oni dominantni karotenoidi u odnosu na β -kriptoksantin koji se nalazi u rasponu od 0,88 do 3,13 mg/kg i β -karotena u rasponu od 0,55 do 2,13 mg/kg, što je sukladno rezultatima Alfieri i sur. (2014). Također, Kurilich i Juvik (1999) provedenim istraživanjem sastava karotenoida na 44 različita genotipa utvrđuju da lutein varira od 0,00 do 27,59 mg/kg, zeaksantin od 0,01 do 7,73 mg/kg, β -karoten od 0,07 do 7,64 mg/kg te β -kriptoksantin od 0,07 do 2,40 mg/kg. Lutein i zeaksantin predominantni su karotenoidi kukuruza (Berardo i sur., 2009; Burt i sur., 2011a; Chander i sur., 2008; Egesel i sur., 2003; Ibrahim i Juvik, 2009; Kurilich i Juvik, 1999; Menkir i sur., 2008; Scott i Eldridge, 2005), a važnost im se očituje i u ljudskom zdravlju. Jedini su makularni karotenoidni pigmenti u oku, a njihova jedinstvena prisutnost odgovorna je za zaštitu oka od slobodnih radikala i bliskog UV plavog svjetla (Wenzel i sur., 2003). Nadalje, leutin i zeaksantin kod peradi daju poželjnu žutu boju potkožnoj masti i jajima, s tim da je žuto-narančasti zeaksantin približno dvostruko učinkovitiji od svijetlo žutog luteina kao sredstva za pigmentiranje žumanjaka (Marusich i Bauernfeind, 1981).



Slika 2.2.3.1. Kemijska struktura nekih od karotenoida prisutnih u zrnu kukuruza
(Izvor: <http://en.citizendium.org/wiki/Lycopene>)

2.3. Antioksidansi

2.3.1. Oksidacija i antioksidacijsko djelovanje

Za život stanice neophodan je oksidacijski metabolizam. Međutim, posljedica ove ovisnosti je nastajanje slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih vrsta koje uzrokuju oksidativne promjene (Antolovich i sur., 2002). Prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala kisika dolazi do oksidacijskog stresa, koji se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Kada se formira višak slobodnih radikala oni mogu prevladati antioksidacijske enzime poput superoksid-dismutaze, katalaze te peroksidaze i uzrokovati destruktivne i smrtonosne stanične efekte oksidacijom membranskih lipida, staničnih proteina, DNA i enzima, te dolazi do prestanka staničnog disanja (Antolovich i sur., 2002). Reaktivne kisikove tvari negativno utječu na prijenos signala u stanici, mogu narušiti homeostazu iona, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Također, oksidacija je glavni uzrok kemijskog kvarenja hrane (Colbert i Decker, 1991), što utječe na pogoršanje prehrambene kvalitete, zdravstvenu zaštitu, sigurnost, boju, okus i teksturu (Shahidi i sur., 1992). Posljednjih godina, oksidacijski stres sve se više upliće u patogenezu mnogih degenerativnih bolesti, uključujući koronarnu srčanu bolest, rak, dijabetes, katarakte i reumatoidni artritis (Gey i sur., 1987; Jacob, 1995; Thompson i Godin, 1995; Temple, 2000). Prirodni inhibitori oksidacije u hrani najčešće potječu od biljnih sastojaka, a proizvode se kao rezultat procesnih induciranih kemijskih promjena u hrani ili se mogu ekstrahirati iz ne-hranjivih sastojaka (Shahidi, 1997).

Slobodni radikal je atom ili molekula s jednim ili više neparnih elektrona u vanjskoj ljusci. Neravnoteža elektrona vanjske ljuske uzrokuje visoku reaktivnost stvarajući druge slobodne radikale lančanim reakcijama (Bendich, 1999; Fang i sur., 2002; Valko i sur., 2006). Slobodni radikali mogu biti reaktivne vrste kisika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS), dušika (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) ili klora (eng. *Reactive Chlorine Species*, RCS). Biokemijski najvažniji su reaktivni oblici kisika, koji mogu biti u obliku peroksil (ROO^\bullet), hidroksid ($^\bullet\text{OH}$) ili superoksid radikala (O_2^\bullet). Pojmom reaktivnih vrsta kisika obuhvaćeni su i neradikalni derivati kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, singletni kisik, itd.) koji nisu slobodni radikali, ali lako mogu dovesti do reakcija slobodnih radikala u biološkim sustavima (Aruoma, 1998). Reaktivni spojevi i njihovi produkti stvaraju se različitim fiziološkim i biokemijskim procesima kao što su mitohondrijsko disanje, aktivacija fagocita, biosinteza endoperoksida ciklooksigenazom i lipooksigenazom, oksidacija različitih spojeva enzimima kao što je ksantin oksidaze i prisutnost metala prijelaznog stanja kao što su Fe^{2+} i Cu^{2+} (Halliwell, 1994, 1996; Yuan i Kitts, 1997). Slobodni radikali mogu uzrokovati oštećenja staničnih struktura i time nepovoljno utjecati na imunološke funkcije (Machlin i Bendich, 1987; Halliwell, 1995; Bendich, 1996; Bauer i sur., 1999).

Antioksidans se definira kao "bilo koja tvar koja, kada je prisutna pri niskim koncentracijama u usporedbi s onima oksidirajućeg supstrata, značajno odgađa ili sprječava oksidaciju tog supstrata" (Halliwell, 1990; Halliwell i sur., 1995). Roginsky i Lissi (2005) antioksidacijsku aktivnost definiraju kao sposobnost spoja (pripravka) da inhibira oksidativnu degradaciju. Antioksidansi ometaju proizvodnju slobodnih radikala ili ih inaktiviraju nakon što se formiraju (Bendich, 1999). Također, tijelu mogu pomoći da se zaštiti od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), kao i onima dušika (RNS) i klora (RCS) (Shahidi, 1997). Vjeruje se da slobodni radikali potiču početnu fazu nekoliko bolesti. Sposobnost prirodnih antioksidansa da reagiraju s slobodnim radikalima čini ih posebno interesantnim (Miller i sur., 2000). Glavni antioksidansi u hrani uključuju vitamine (vitamin C i E), karotenoide, klorofile i široki spektar antioksidacijskih fitokemikalija kao što su jednostavni fenolni spojevi, flavonoidni glikozidi i složeni polifenoli nastali kondenzacijom različitih fenolnih spojeva (Kris-Etherton i sur. 2002; Pellegrini i sur., 2003; Stanner i sur., 2004; Rice-Evans i sur., 1996). Neki prirodni antioksidansi kao što su vitamin C, vitamin E i β -karoten opsežno su proučavani. Vitamin E glavni je antioksidans topiv u lipidima u staničnim membranama, štiti od peroksidacije lipida i sprečava gubitak membranske fluidnosti. Vitamin E karakterizira se kao najaktivniji antioksidans u krvi (Burton i sur., 1983). Vitamin C topiv je u vodi i zajedno s vitaminom E može ugasiti slobodne radikale kao i singlet kisik (Frei, 1991). Također, vitamin C može regenerirati reducirani antioksidacijski oblik vitamina E (Bendich i sur., 1986).

Antioksidansi iz prirodnih izvora često su prisutni u kombinacijama koje uključuju mnoge različite spojeve. Svaki spoj može biti prisutan zajedno sa svojim prekursorom i reakcijskim proizvodom. Prema tome, način djelovanja prirodnih izvora antioksidansa može varirati i može uključivati više mehanizama djelovanja, ovisno o vrsti i izvoru upotrijebljenog materijala (Shahidi, 2000). Općenito, fenoli, svi spojevi koji sadrže fenolnu skupinu, su glavni antioksidacijski sastojci hrane (Shahidi, 1995). U biljnim uljima i mastima to su uglavnom monofenoli, prije svega tokoferoli (vitamin E) (Roginsky i Lissi, 2005). Interes za antioksidansima u hrani proizlazi iz četiri glavna razloga: oni mogu štititi samu hranu od oksidativnih oštećenja, mogu djelovati antioksidacijski u gastrointestinalnom traktu, mogu se apsorbirati i djelovati antioksidacijski u drugim tjelesnim tkivima i mogu se koristiti u biljnim ekstraktima, ili kao čisti spojevi, kao terapijska sredstva (Halliwell, 1999). Antioksidacijski spojevi mogu pridonijeti zdravstvenom potencijalu hrane, a antioksidacijska aktivnost jedna je od najvažnijih obilježja u definiciji prehrambene kvalitete hrane (Rice-Evans i sur., 1997). Antioksidacijski spojevi mogu biti prirodno prisutni u različitim oblicima u mikrostrukturi hrane. Gledajući lokalizaciju antioksidansa u hrani, oni se u osnovi mogu svrstati u sljedeće kategorije:

1. Spojevi niske molekulske mase, koji nisu kemijski ili fizički interakcijski s drugim makromolekulama,
2. Spojevi, koji su fizički zarobljeni u različitim staničnim strukturama,
3. Spojevi niske molekulske mase, koji su kemijski vezani za druge makromolekule,

4. Netopivi antioksidacijski materijal (obično velike molekularne težine) (Gökmen i sur., 2009).

Među brojnim podjelama antioksidansa, najjednostavnija je ona na organele, antioksidacijske enzime i malene molekule antioksidansa (tvari topive u lipidima i tvari topive u vodi). U ovu svrhu viši aerobni organizmi razvili su tri sustava:

1. Specijalizirane stanične organele kao što su mitohondriji i lizosomi odvajaju veće količine slobodnih radikala od ostalih vitalnih dijelova stanice,
2. Proizvodnja staničnih enzima: superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, askorbat peroksidaza koji sadrže mineralne antioksidanse (Mn, Cu, Zn, Se, Fe) te imaju zaštitno antioksidacijsko djelovanje,
3. Korištenje antioksidansa: vitamina A, E, C, urične kiseline, karotenoida, polifenola, selen i nekih aminokiselina (Macan i sur., 2011; Prior i Cao., 2001).

2.3.2. Antioksidacijska aktivnost zrna kukuruza

Od brojnih prirodnih antioksidansa, kukuruz sadrži tokole (vitamin E, 17 mg/kg), feruličnu kiselinu i druge fenolne spojeve, zein, fitinsku kiselinu, te karotenoide (vitamin A ekvivalent - 2324 IJ/kg) koji svi zajedno djeluju protiv opasnih slobodnih radikala ili oksidansa (Bacchetti i sur., 2013, Grbeša, 2008). Prema Alfieri i sur. (2014) utjecaj karotenoida na ukupnu antioksidacijsku aktivnost manji je od 5%, no treba napomenuti da to ovisi o metodi određivanja antioksidacijske aktivnosti. Osim karotenoida kukuruz je bogat fenolima i antocijaninima koji više doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti, te ukupni sadržaj fenola pokazuje visoku povezanost s antioksidacijskom aktivnošću zrna kukuruza (Žilić i sur., 2012; Hu i Xu, 2011; Lopez-Martinez i sur. 2009,). Adom i sur. (2005) navode da zrno kukuruza sadrži nekoliko puta više (2194-3010 mg/kg) ukupnih fenola od drugih žitarica. U zrnu kukuruza fenoli se mogu nalaziti u slobodnom i vezanom obliku. Slobodni fenoli nalaze se u vanjskom perikarpu biljke te se mogu ekstrahirati organskim otapalima, dok su vezani esterificirani na stjenku biljne stanice te se značajno teže oslobađaju (Dykes i Rooney, 2007).

Antioksidacijska aktivnost kukuruza nije često ispitivana u usporedbi s voćem i povrćem ali u literaturi se mogu naći radovi u kojima ima podataka o antioksidacijskoj aktivnosti istog. Prije uspostavljanja direktnih metoda za utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti uobičajen način je bio odvojeno mjerenje antioksidacijske aktivnosti lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata te je zbroja tih vrijednosti prikazan kao antioksidacijski rezultat. Na taj način Cao i sur. (1996) utvrdili su da kukuruz u svježem uzorku ima višu antioksidacijsku aktivnost od patlidžana, cvjetače, krumpira, batata, zelja, zelene salate, graha, mrkve, celera, ali nižu od češnjaka, kelja, špinata, prokulica, brokule, repe i luka. Međutim, kad je riječ o suhoj tvari, rezultat kukuruza iznosi 38,9 μ mol ekvivalenata Troloxa/g što je više samo od

rezultata krumpira, batata, celera i krastavca. Na isti način Wu i sur. (2004) utvrdili su da je vrijednost antioksidacijske aktivnosti lipofilne frakcije zrna kukuruza u svježem uzorku viša od antioksidacijske aktivnosti većine ostalog istraživanog voća i povrća ljudske prehrane (jabuke, banane, kivija, šljive, graška, zelja, mrkve, bundeve, slatkoga krumpira itd.). Ovakav pristup određivanju antioksidacijske aktivnosti ne daje pravi uvid u stvarno antioksidacijsko djelovanje. Antioksidansi mogu sinergijski djelovati te na taj način povećati aktivnost izvora. Razvojem direktnih metoda omogućeno je mjeriti ukupni antioksidacijski kapacitet žitarica točno i precizno u jednom koraku. Podaci dobiveni direktnom metodom izravno se odnose na antioksidacijsko djelovanje u hrani ili u ljudskom gastrointestinalnom traktu specifičnog mehanizma djelovanja koji se ispituje u korištenoj metodi. Zapravo, istovremeno se uzima u obzir istodobno djelovanje svih antioksidansa prisutnih u uzorcima dok je u postupku višestruke ekstrakcije ukupni kapacitet antioksidansa suma antioksidacijskih sposobnosti topivih i netopivih frakcija izmjerenih u različitim vremenima (Serpen i sur., 2008).

Žilić i sur. (2012) u istraživanju provedenom na 10 različitih genotipova kukuruza različite obojenosti zrna navode da veći sadržaj fenolnih spojeva u kukuruznom zrnu doprinosi njihovoj višoj antioksidacijskoj aktivnosti. Nadalje, Lopez-Martinez i sur. (2009) su utvrdili da pigmentirani crni, ljubičasti, crveni i plavi kukuruz pokazuju relativno veću aktivnost neutralizacije radikala od nepigmentiranih uzoraka. Razlike u kapacitetu antioksidansa među crvenim, plavim i purpurnim genotipovima kukuruza su povezane sa specifičnim sastavom antocijanskih derivata kao što su jednostavni ili acilirani glikozidi cijanidina, pelargonidina ili peonidina (Stintzing i sur., 2002)

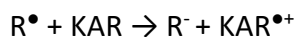
2.3.3. Antioksidacijska aktivnost karotenoida

Karotenoidi pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost te povećavaju metaboličku detoksikaciju (Kelloff i Boone, 1994). Postoje različite obrambene strategije i mehanizmi djelovanja karotenoida kao antioksidansa. Smatra se da su karotenoidi vrlo učinkoviti neutralizatori singlet kisika (pobuđena molekula kisika, $^1\text{O}_2$) i peroksilnog radikala. Također, efikasni su deaktivatori molekula osjetljivih na elektronsko pobuđivanje koje sudjeluju u stvaranju radikala i $^1\text{O}_2$ (Stahl i Sies, 2003; Truscott, 1990; Young i Lowe, 2001).

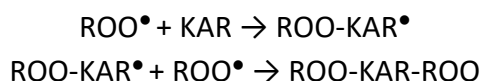
Neutralizacija pobuđene molekule kisika (singlet kisik, $^1\text{O}_2$) temelji se na fizikalnoj i kemijskoj interakciji karotenoida i pobuđene molekule kisika (Krinsky, 1989). Fizikalna neutralizacija uključuje direktni prijenos energija između obje molekule (Stahl i Sies, 2003; Krinsky, 1989). Energija se prenosi s pobuđene molekule kisika na karotenoid kako bi kisik postigao osnovno energetska stanje, a molekula karotenoida prenosi dobivenu energiju na okolnu otopinu vraćajući se u stabilnu elektronsku konfiguraciju. Jedinstveno djelovanje za karotenoide je da se, budući da zauzimaju pojedinačni kisik, dobivena energija oslobađa u

obliku topline, pa stoga nije potreban regenerativni sustav, kao što je potreban za α -tokoferol (Sies i sur., 1992). Poput vitamina E, karotenoidi, uključujući β -, γ -karoten i likopen, topljivi su u lipidima i mogu se prenositi unutar lipoproteinskih čestica. β -karoten ima dodatnu prednost da može neutralizirati više lipidnih slobodnih radikala od α -tokoferola, a molekula spomenutog α -tokoferola može neutralizirati najviše dvije molekule. Vjeruje se da jedna molekula β -karotena na ovaj način može eliminirati do 1 000 molekula singletnih kisika, prije nego što se oksidira i izgubi svojstva antioksidansa (Stahl i Sies, 2003; Krinsky, 1989). *In vitro* istraživanja pokazuju da je 2 mmol β -karotena jače od 40 mmol α -tokoferola u inhibiranju oksidativne modifikacije LDL (Jialal i Grundy, 1992; Woodall i sur., 1996). Za razliku od fizičke neutralizacije, kemijske reakcije između uzbuđenog kisika i karotenoida manje su važne, sudjeluju manje od 0,05% u ukupnoj neutralizaciji $^1\text{O}_2$. Budući da karotenoidi ostaju netaknuti tijekom fizičke neutralizacije od $^1\text{O}_2$ ili ekscitacijskih senzibilizatora, mogu se ponovno upotrijebiti nekoliko puta u takvim ciklusima (Stahl i Sies, 2003).

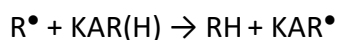
Između različitih vrsta radikala koji se stvaraju pri pro-oksidacijskim uvjetima u organizmu, karotenoidi najefikasnije neutraliziraju peroksil radikale. Zbog njihovog nastajanja u procesu peroksidacije lipida suzbijanje ove vrste prekida slijed reakcija koje konačno vode do oštećenja u lipofilnim odjeljcima. Surai (2002) opisuje tri različita mehanizma djelovanja karotenoida prilikom neutralizacije peroksil radikala; Transfer elektrona:



Mehanizam reakcije adicije uključuje stvaranje karotenoid radikala koji može reagirati s drugim radikalom pri čemu nastaje neradikalni produkt:



Zadnji mehanizam je prijenos vodika pri čemu nastaje neutralni karotenoid radikal:



Antioksidacijska aktivnost karotenoida ovisi o tlaku kisika prisutnih u sustavu (Burton i Ingold, 1984; Palozza, 1998). Na niskom parcijalnom tlaku kisika (15-160 mm HG), normalno prisutan u fiziološkim uvjetima, karotenoidi su izvrsni supstrat za napad slobodnih radikala te inhibiraju oksidaciju (Sies i sur., 1992; Krinsky, 1993). Nasuprot tome, u uvjetima visokog parcijalnog tlaka kisika (viši od 150 mm Hg) pri visokim koncentracijama β -karotena, dolazi do pro-oksidacijskog djelovanja (Palozza i sur., 1995). U takvim uvjetima karotenoidi mogu reagirati s kisikom pri čemu nastaje karotenoid peroksil radikal čime se nastavlja danji pro-oksidacijski učinak (Woodall i sur. 1997b).

2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Iako je do sada razvijeno mnoštvo metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, navedeno svojstvo antioksidansa ne može se direktno izmjeriti niti jednom metodom. Antioksidacijska se aktivnost mjeri preko djelovanja jednog ili više antioksidansa u kontroli opsega oksidacije. Značajke oksidacije su supstrat, oksidant i inicijator, međuprodukti i konačni produkti, a mjerenje koncentracije bilo kojeg od ovih spojeva se može koristiti za procjenu antioksidacijske aktivnosti (Antolovich i sur., 2002).

Neke metode uključuju poseban oksidacijski korak (ekstrakcija), praćen mjerenjem ishoda, dok u izravnim metodama ne postoji jasna razlika između različitih koraka u postupku. Postupak ekstrakcije kritičan je korak u neizravnim metodama te je mjerenje antioksidacijske aktivnosti ograničeno na topljivi materijal. Međutim, sastojci hrane imaju složene strukture u kojima pojedini antioksidacijski spojevi mogu biti prisutni u različitim oblicima i mogu biti u potpunosti topljivi u otapalu, ali i potpuno netopivi. Razlike u uvjetima ekstrakcije primijenjene prije mjerenja sposobnosti antioksidansa važan su izvor varijacija u dobivenim vrijednostima. Izravne metode za mjerenje kapaciteta antioksidansa izbjegavaju dugotrajnu ekstrakciju otapala i korake hidrolize. Budući da i topljivi i netopivi dijelovi hrane istovremeno dolaze u dodir s radikalima, izravni postupak je u mogućnosti mjeriti ukupni antioksidacijski kapacitet točno i precizno u jednom koraku.

Razvijene metode određivanja antioksidacijske aktivnosti međusobno se razlikuju prema tehnici mjerenja, izboru slobodnog radikala ili izboru supstrata, no prema mehanizmu djelovanja, kao što je prikazano u Tablici 2.4.1., većina se metoda može podijeliti u dvije kategorije (Huang i sur., 2005):

1. Metode bazirane na prijenosu vodikovog atoma – HAT (*eng. Hydrogen Atom Transfer*) metode,
2. Metode bazirane na prijenosu elektrona – ET (*eng. Electron Transfer*) metode.

Metode bazirane na prijenosu vodikovog atoma mjere sposobnost antioksidansa da neutralizira slobodne radikale davanjem vodikovog atoma. Neutralizacija slobodnih radikala može se pratiti spektrofotometrijski ili fluorescencijski u usporedbi sa slijepom probom bez prisutnosti antioksidansa. Mehanizam prijenosa elektrona bazira se na reakciji antioksidansa s medijem kao oksidansom, pri čemu je posljedica redukcije promjena boje medija. Veći doseg promjene boje, tj. veća koncentracija neutraliziranog oksidansa predstavlja jaču aktivnost ispitivanog antioksidansa.

Tablica 2.4.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti (Izvor: Kljak, 2012)

Metoda		Mjerenje
Transfer atoma vodika	ORAC	Smanjenje fluorescencije nakon inhibicije antioksidansom
	TRAP	Određivanje kisika potrebnog za kontroliranu lipidnu oksidaciju
	Metoda izbjeljivanja krocina ili β -karotena	Apsorbancija nakon redukcije krocina ili β -karotena
	Inhibicija oksidacije linolne kiseline	Apsorbancija tiobarbituratnog derivata MDA pri 532 – 535 nm
	Inhibicija LDL oksidacije	Određivanje specifičnog produkta oksidacije (npr. heksanal)
Transfer elektrona	TEAC	Apsorbancija radikal kationa ABTS ^{•+} pri 734 nm nakon neutralizacije
	FRAP	Apsorbancija „FRAP reagensa“ pri 593 nm nakon redukcije Fe(III)
	DPPH	Apsorbancija radikal kationa DPPH [•] pri 515 nm nakon neutralizacije

ORAC eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity; TRAP eng. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter; MDA –malondialdehid; LDL eng. Low Density Lipoprotein; TEAC eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; ABTS^{•+}– 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin- sulfonska kiselina) diamonijeva sol; FRAP eng. Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter; DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

2.5. Zimski rokovi berbe kukuruza

Znatan broj ratara zbog raznih razloga, najčešće nepovoljnih vremenskih uvjeta u vrijeme uobičajene berbe, bere kukuruz tijekom zimskih mjeseci što je dodatan stres za biljku. Visoka razina padalina u jesen, blato, poplave, lošija mehanizacija, manjak radne snage te manjak skladišnog prostora neki su od razloga koji dovode do odgode berbe. Svake godine dio kukuruza ostane u polju preko zime, a te površine su značajnije izražene za izrazito vlažnih godina. Praksa koju koriste neki proizvođači je odbacivanje tipične jesenje žetve, ostavljaju kukuruz da se isušuje na polju tijekom zime, a žetvu obave u proljeće, kada žetva zrna ne zahtjeva troškove sušenja (Mahoney i sur., 2015). Iako olakšava dodatni trošak sušenja kukuruza visoke vlage i skladištenja suhog kukuruza tijekom zime, boravak usjeva na polju tijekom zime utječe na bojenje usjeva i prinos zrna (Lauer, 2004; Mills i Frydman, 1980). Takav kukuruz najčešće je zaražen plijesnima koje se lošim skladištenjem prošire na sav kukuruz u skladištu. Plijesni proizvode mikotoksine koji štetno utječu na zdravlje ljudi i životinja.

Thomison i sur. (2011) su na različitim hibridima i gustoći sjetve istraživali razlike u prinosu zrna i propadanju i lomu stabljike kukuruza tijekom zimskih rokova berbe. Slično istraživanje su proveli Mahoney i sur. (2015) koji su ispitali razliku između vlage, prinosa i mase zrna u jesen i proljeće, te lomljivost stabljike kukuruza u proljeće. U oba slučaja je prinos zrna bio manji u zimskim rokovima berbe u odnosu na optimalne rokove. Svojstva koja su promatrana u ovom istraživanju nisu promatrana kod navedenih autora. Istraživanja u kojima se ispituje utjecaj zimske berbe na kvalitetu zrna kukuruza su oskudna, a do sada nije istraživano kako utječe na sadržaj karotenoida i antioksidacijsku aktivnost zrna.

3. Materijali i metode

3.1. Hibridi kukuruza

U istraživanju su korištena četiri Bc hibrida kukuruza različitih FAO grupa u tipu zubana i kvalitetnog zubana (Tablica 3.1.1).

Tablica 3.1.1. Korišteni hibridi kukuruza u istraživanju.

HIBRID	FAO GRUPA	TIP
Bc 344	300	Kvalitetan zuban
Bc 353	400	Zuban
Bc 572	500	Kvalitetan zuban
Pajdaš	490	Kvalitetan zuban

Prema proizvođaču sjemena karakteristike Bc hibrida na kojima su provedena istraživanja su (Bc Institut, 2018):

- hibrid Bc 344 predstavlja odličnu kombinaciju svih gospodarskih svojstava. Karakterizira ga visok i stabilan urod te niska i čvrsta stabljika. Klip je velik, nisko nasaden, a zrno krupno i crvenkasto (Slika 3.1.1.),
- hibrid Bc 353 visoke je i čvrste stabljike, rano porasta. Velikog je klipa s 14 do 16 redova krupnog zrna te brzo otpušta vodu iz zrna. U okviru svoje grupe hibrid je s visokim prinosom (Slika 3.1.2.),



Slika 3.1.1. *Hibrid Bc 344*
(Izvor: <http://www.bc-institut.hr/>)



Slika 3.1.2. *Hibrid Bc 353*
(Izvor: <http://www.bc-institut.hr/>)

- hibrid Bc 572 odlikuje se odličnom kvalitetom zrna, brzim otpuštanjem vode iz zrna te nižom i čvrstom stabljikom. List je zelen i dug, a klip velik i privlačnog izgleda (Slika 3.1.3.),
- Pajdaš se odlikuje visokim urodom i kvalitetom zrna. Odličnog je ranog porasta, niske i čvrste stabljike te dugo zelenog lista. Velikog je klipa, krupnog i crveno zrna (Slika 3.1.4.).



Slika 3.1.3. *Hibrid Bc 372*
(Izvor: <http://www.bc-institut.hr/>)



Slika 3.1.4. *Pajdaš*
(Izvor: <http://www.bc-institut.hr/>)

3.2. Lokacija i vremenske prilike

Provedeno istraživanje je dio pokusa u kojem se istraživao utjecaj prezimljavanja na fizikalno-kemijska svojstva zrna kukuruza. Na testnom polju u Rugvici zasijana su četiri Bc hibrida sjemenarske kuće Bc Institut d.o.o. Hibridi kukuruza proizvedeni su tijekom vegetacijske sezone 2015. godine u istim uvjetima intenzivne agrotehnike, te zatim ostavljeni na polju do proljeća 2016. godine. Minimalne, prosječne i maksimalne temperaturne razlike po dekadama tijekom promatranog razdoblja prezimljavanja prikazane su u Tablici 3.2.1. Vrijednosti su izmjerene u obližnjoj meteorološkoj postaji, Oborovo.

Tablica 3.2.1. Prikaz temperaturnih razlike po dekadama tijekom razdoblja prezimljavanja na testnom polju Rugvica; meteorološka postaja Oborovo

Temperatura/ °C				
Mjesec	Dekada	Minimalna	Prosječna	Maksimalna
listopad 2015.	I	9,8	13,3	18,1
	II	7,8	9,8	13,2
	III	4,4	8,5	14
prosjeck		7,2	10,5	15,1
dan min/max		31.lis		4.lis
studeni 2015.	I	0,4	6,9	16,6
	II	3,9	10,5	17,9
	III	0,5	3,1	7,1
prosjeck		1,6	6,8	13,9
dan min/max		3.stu		9.stu
prosinac 2015.	I	1,8	4,2	6,6
	II	-0,8	1	3,3
	III	-2,5	1,9	7,4
prosjeck		-0,6	2,3	5,8
dan min/max		31.pro		23.pro
siječanj 2016.	I	-5,2	-2,1	0,8
	II	-3	1,3	5,4
	III	-2,4	3,6	9,6
prosjeck		-3,5	1	5,4
dan min/max		5.sij		28.sij
veljača 2016.	I	3	8,1	13,6
	II	2,6	5	8
	III	2,9	7	11
prosjeck		2,8	6,7	10,8
dan min/max		5.vlj		1.vlj
ožujak 2016.	I	3,3	6,6	10,3
	II	1,9	6,5	11,4
	III	5,4	9,6	14,7
prosjeck		3,6	7,6	12,2
dan min/max		18.ožu		31.ožu

Tijekom razdoblja prezimljavanja prema Tablici 3.2.1., najniža prosječna temperatura od -3,5 °C je zabilježena u siječnju, a najniža dnevna temperatura od -5,2 °C zabilježena je 5. siječnja. Navedeno ukazuje na smrzavice tijekom prve dekade siječnja. Također, temperatura ispod ledišta vode zabilježena je tijekom noći druge i treće dekade prosinca. Maksimalna prosječna temperatura zraka kretala se od 5,4 °C u siječnju do 15,1 °C u listopadu, što predstavlja neočekivano blagu i toplu zimu. Padaline tijekom promatranog razdoblja prezimljavanja prikazuje Tablica 3.2.2. Najveća količina padalina od 200,9 mm zabilježena je tijekom listopada, dok je veći dio studenog i prosinca bio uglavnom suh. Iznenadujuće, tijekom veljače zabilježena je višestruko veća količina padalina u odnosu na višegodišnji prosjek.

Tablica 3.2.2. Prikaz padalina po dekadama na testnom polju Rugvica; meteorološka postaja Oborovo

Padaline		
Mjesec	Dekada	(mm)
listopad 2015.	I	43,2
	II	157,7
	III	0
prosjeck		200,9
višegodišnji prosjeck		83,4
studenj 2015.	I	0
	II	0
	III	43,5
prosjeck		43,5
višegodišnji prosjeck		89,3
prosinac 2015.	I	3,8
	II	0
	III	0
prosjeck		3,8
višegodišnji prosjeck		74,5
siječanj 2016.	I	74,2
	II	16,4
	III	0
prosjeck		90,6
višegodišnji prosjeck		67,8
veljača 2016.	I	12,5
	II	108,7
	III	39,6
prosjeck		160,8
višegodišnji prosjeck		85,4
ožujak 2016.	I	37,2
	II	10,1
	III	8,7
prosjeck		56
višegodišnji prosjeck		50,2

3.3. Uzorkovanje

Svaki hibrid zauzimaao je oko 1 000 m² pokusne parcele, zasijan u osam redova. Za ovo istraživanje provedena su tri roka berbe tijekom prezimljavanja, na unaprijed određenim mjestima testnog polja. Prvi rok berbe, odnosno uobičajeno vrijeme berbe, bio je 15.10.2015. Drugi je rok bio tri mjeseca nakon uobičajenog roka berbe, 13.01.2016. a treći rok pet mjeseci nakon uobičajenog roka berbe, 14.03.2016.

Klipovi kukuruza ubrani su iz četiri središnja reda te ručno orunjeni, prosušeni na 60 °C i čuvani na + 4 °C zaštićeni od svjetla. Neposredno prije početka analize reprezentativni uzorci samljeveni su kroz sito 1 mm (Cyclotec, Tecator, Švedska).

3.4. Kemijske analize

3.4.1. Određivanje vlage uzorka

Sadržaj vlage u uzorcima određen je prema HRN ISO 6496:2001 normi (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo 2001). U prethodno izvagane posudice za određivanje vlage izvagano je 3 g uzorka. Uzorci su 4 sata sušeni na 103 ± 2 °C (UFE 400, Memmert, Njemačka), a nakon sušenja, posudice su ohlađene na sobnu temperaturu u eksikatoru i izvagane. Udio vlage je određen na temelju razlike masa prije i nakon sušenja.

3.4.2. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna kukuruza

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti zrna kukuruza istraživanih hibrida provedeno je TEAC (*eng. Trolox Equivalent Antioxidant Activity*) metodom prema postupku opisanom u radu Serpen i sur. (2008). Navedena metoda zasniva se na neutralizaciji stabilnog radikal kationa ABTS^{•+} (2,20-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) antioksidansima uzorka. Neutralizacijom dolazi do obezbojenja plavo-zelene ABTS^{•+} otopine stabilnog radikal kationa, a doseg se može pratiti spektrofotometrijski. Doseg neutralizacije ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta. Ishodna otopina ABTS^{•+} pripremljena je reakcijom 7 mmol/L vodene otopine ABTS-a i 2,45 mmol/L otopine natrijeva persulfata, a stabilna koncentracija radikal kationa postignuta je nakon stajanja 12-16 sati u mraku pri sobnoj

temperaturi (Re i sur., 1999). Radna otopina korištena za mjerenje ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna kukuruza pripremljena je razrjeđenjem dobivene ABTS^{•+} otopine sa smjesom etanol:voda (50:50, v/v) do vrijednosti apsorbancije otopine $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm. Mjerenje apsorbancije je provedeno na spektrofotometru *Helios γ* (Thermo Electron Corporation, UK). Uzorci prije mjerenja nisu bili razrijeđeni s celuloznim prahom, kao što opisuju Serpen i sur. (2008), jer izmjerene vrijednosti apsorbancije nisu bile izvan područja linearnog odziva radikalne otopine za obezbojenje.

Postotak inhibicije izračunat je prema apsorbancijama prije (A_{ABTS}) i poslije neutralizacije ($A_{ABTS + UZORAK}$),

$$\% \text{ Inhibicije} = \frac{A_{ABTS} - A_{ABTS + UZORAK}}{A_{ABTS}} \times 100$$

a prema baždarnom pravcu standarda Trolax (u vodi topiv analog vitamina E) kapacitet antioksidansa je izražen kao mmol Trolaxa ekvivalentnog kapaciteta antioksidansa po kilogramu uzorka.

3.4.3. Određivanje sadržaja karotenoida

U istraživanju je određen sadržaj ukupnih karotenoida četiri Bc hibrida tijekom razdoblja prezimljavanja prema metodi opisanoj u radu Kljak i sur. (2009). U epruvetu za centrifugu od 15 mL izvagano je 0,5-0,6 g samljevenog i homogeniziranog uzorka kukuruza te hidratizirano 60 minuta s 2 mL ultračiste vode. Svakom uzorku dodano je 4 mL acetona te je smjesa homogenizirana uz dodatak 1 mL 0,5 % otopine NaCl. Nakon homogenizacije dodano je 2 mL heksana, te je smjesa vorteksirana 30 sekundi. Nakon 5 minuta centrifugiranja (Centric 322A, Tehnica, Slovenija) pri 4 000 rpm, u pripadajuću odmjernu tikvicu ukupnog volumena 10 mL, odvojen je gornji heksanski sloj. Postupak ekstrakcije je ponavljan do obezbojenja heksanskog sloja, a odmjerna tikvica je nakon četiri faze ekstrakcije nadopunjena heksanom tako da ukupni volumen bude 10 mL. Apsorbancija heksanskog ekstrakta je mjerena u rasponu 400-480 nm UV/Vis spektrofotometrom *Helios γ* (Thermo Electron Corporation, UK), a za kvantifikaciju je uzeta apsorbancija u piknu. Sadržaj ukupnih karotenoida uzorka izražen je kao $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka koristeći standardnu otopinu $\beta\text{-karotena}$ u heksanu za izradu baždarnog pravca (Olson, 1996.). Svaki uzorak analiziran je u triplikatu te je izračunata srednja vrijednost.

3.5. Statistička obrada podataka

Sadržaj karotenoida i ukupna antioksidacijska aktivnost zrna kukuruza istraživanih hibrida obrađeni su kombiniranom analizom varijance pri čemu su rok berbe i njihova interakcija bili fiksni efekti. Statistička obrada podataka provedena je PROC MIXED procedurom statističkog paketa SAS 9.3 (Statistical Analysis System, 2011). Razlike su smatrane značajnima ukoliko je $P \leq 0,05$. Sve vrijednosti prikazane u grafikonima su LS means dobivene korištenjem PDIFF naredbe.

4. Rezultati i rasprava

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj zimskih rokova berbe na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna četiri Bc hibrida kukuruza (Bc 344, Bc 353, Bc 572 i Pajdaš) proizvedenih na testnom polju Bc Instituta u Rugvici, pri istim agroklimatskim uvjetima. Nakon uzimanja kontrolnih uzoraka zrna u listopadu 2015., uobičajeno razdoblje berbe, uzeti su uzorci u siječnju i ožujku 2016. (tri i pet mjeseci nakon uobičajene berbe). Sve analize provedene su u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.

4.1. Ukupni sadržaj karotenoida

Kombiniranom analizom varijance utvrđen je značajan utjecaj hibrida, roka berbe i njihove interakcije na sadržaj ukupnih karotenoida u zrnu kukuruza ($P < 0,001$), što prikazuje Tablica 4.1.1.

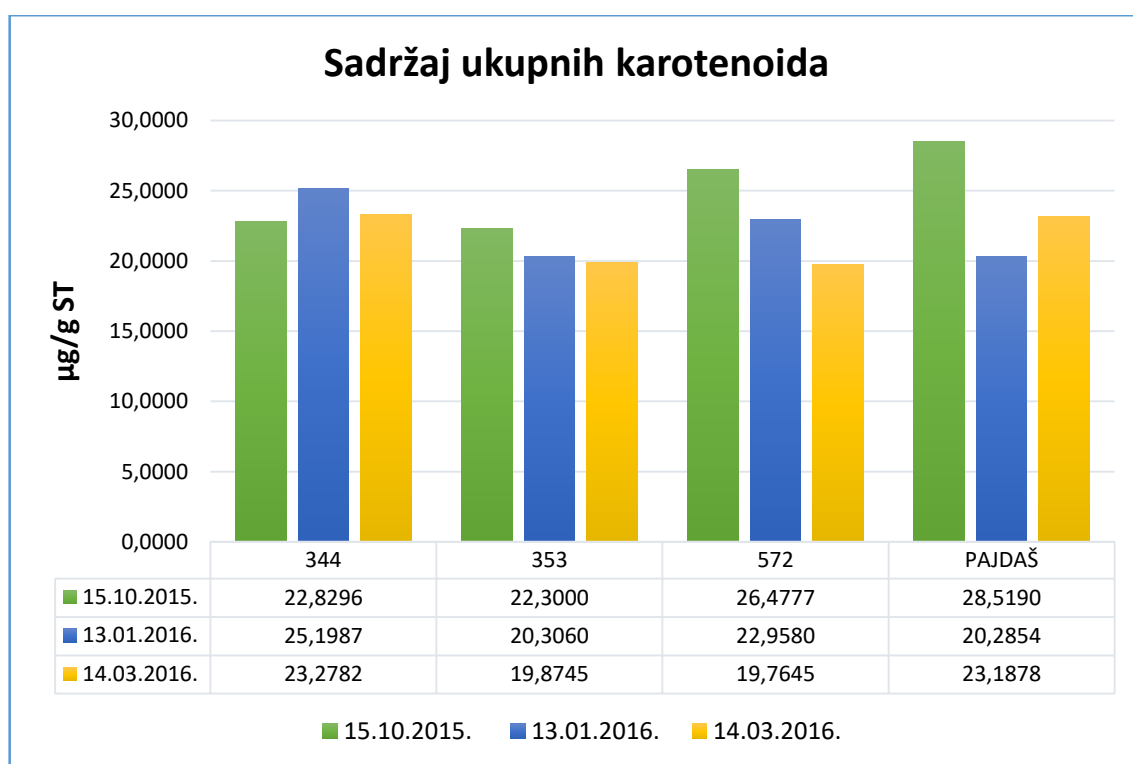
Tablica 4.1.1. Rezultati analize varijance sadržaja karotenoida ispitivanih hibrida kukuruza tijekom prezimljavanja

	<i>Hibrid</i>	<i>Rok berbe</i>	<i>Hibrid × Rok berbe</i>
<i>df</i>	2	3	6
<i>F</i>	43,59	97,93	47,87
<i>Pr > F</i>	***	***	***

Značajno za navedenu *P* vrijednost: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

U tri repeticije određena je srednja vrijednost ukupnih karotenoida u zrnu kukuruza četiri Bc hibrida za svaki rok berbe, a rezultate istraživanja prikazuje Grafikon 4.1.1. Prema prosijeku sva tri roka berbe hibridi se međusobno razlikuju u sadržaju karotenoida ($P < 0,001$). Najviša vrijednost zabilježena je kod hibrida Pajdaš (24 $\mu\text{g/g}$), nešto niža kod Bc 344 (23,67 $\mu\text{g/g}$) i Bc 572 (23,07 $\mu\text{g/g}$) te najniža kod Bc 353 (20,83 $\mu\text{g/g}$). Također, hibridi se međusobno značajno razlikuju unutar istog roka berbe. Najveća razlika u sadržaju ukupnih

karotenoida između hibrida vidljiva je u prvom roku berbe, a vrijednosti se kreću od 22,30 $\mu\text{g/g}$ (Bc 353) do 28,52 $\mu\text{g/g}$ (Pajdaš). Najvišu vrijednost u drugom i trećem roku berbe ostvario je hibrid Bc 344 (25,20 $\mu\text{g/g}$ i 23,28 $\mu\text{g/g}$). S druge strane, najnižu vrijednost u drugom roku berbe ostvario je Pajdaš (20,29 $\mu\text{g/g}$), a u trećem roku Bc 572 (19,76 $\mu\text{g/g}$). Utjecaj hibrida na sadržaj karotenoida u zrnu kukuruza u skladu je s utjecajem genotipa, koji prema Kurilich i Juvik (1999) objašnjava 88-97% varijacija, dok preostale varijacije uzrokuju vremenske prilike i lokacija (Rodriguez-Amaya i sur., 2008). Utjecaj genotipa na sadržaj karotenoida je utvrđen i u radovima Egesel i sur. (2003), Hulshof i sur. (2007), Kurilich i Juvik (1999), Burt i sur. (2011a), Chander i sur. (2008), te Senete i sur. (2011).



Grafikon 4.1.1. Sadržaj ukupnih karotenoida istraživanih hibrida kukuruza tijekom promatranog razdoblja prezimljavanja

Na istoj lokaciji Kljak i sur. (2009) su, na 18 hibrida Bc instituta proizvedenih tijekom 2008. godine, odredili sadržaj ukupnih karotenoida primjenom iste metode ekstrakcije, a rezultati se nalaze u rasponu između 13,31 i 47,47 $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka. Vrijednosti kod usporedivih hibrida iznosile su 41,7 (Bc 572) $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka i 27,45 (Pajdaš) $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka što je različito od istih hibrida u ovom istraživanju. Također, Kljak i Grbeša (2015) su u istraživanju na 6 hibrida istog proizvođača (Bc Institut) proizvedenih 2008. godine na lokaciji u istočnoj Hrvatskoj utvrdili raspon sadržaja karotenoida od 16,99 do 30,04 $\mu\text{g/g}$. Sadržaj karotenoida kod Bc 572 iznosio je 30,04 $\mu\text{g/g}$, a kod Pajdaša 27,44 $\mu\text{g/g}$. Razlike u sadržaju karotenoida kod usporedivih hibrida mogu se objasniti utjecajem agroekoloških

uvjeta. Karotenoidi predstavljaju zaštitni mehanizam biljke (Moussa i Abdel-Aziz, 2008; Mohammadkhani i sur., 2007) te njihov sadržaj raste tijekom nalijevanja zrna ako su stresni uvjeti, što uzrokuje više vrijednosti za isti hibrid na lokacijama gdje su stresni uvjeti (Jaleel i sur., 2009). Velik raspon u sadržaju karotenoida između hibrida kukuruza vidljiv je i u istraživanju Alfieri i sur. (2014). Navedeni autori ispitali su 100 talijanskih genotipova kukuruza i 9 javnih linija iz banke gena što je rezultiralo kretanjem sadržaja ukupnih karotenoida od 11,36 do 33,63 mg/kg ST na talijanskim linijama i od 6,53 do 24,08 mg/kg ST u javnim linijama.

Tijekom istraživanja ispitivani hibridi bili su izloženi nepovoljnim uvjetima prezimljavanja, što uzrokuje stres za biljku. Poznato je da stresni uvjeti povećavaju zarazu mikroorganizmima (Miller, 2000; Park i sur., 1996). Na istim hibridima pri istim rokovima uzorkovanja Fureš i sur. (2017) su utvrdili rast udjela puno pljesnivih zrna od 5,94% i rast od 35,74% malo pljesnivih zrna, s kasnijim rokovima berbe. Rezultati dobiveni u tom radu poklapaju se s istraživanjem koje su proveli Robertson i sur. (2010). Plijesni razgrađuju perikarp zbog čega je endosperm izložen kisiku i vremenskim uvjetima što dovodi do razgradnje karotenoida i gubitku ostalih hranjivih tvari. Zbog navedenog, tijekom prezimljavanja očekivan je pad vrijednosti karotenoida s rokom berbe, što je utvrđeno kod prosječnog sadržaja karotenoida (prosjeak svih hibrida) unutar pojedinog roka berbe. U prvom roku berbe je iznosio 25,03 µg/g, u drugom 22,19 µg/g, a najniža vrijednost od 21,53 µg/g zabilježena je u posljednjem roku berbe.

Međutim, pad sadržaja karotenoida tijekom rokova berbe nije utvrđen kod svih hibrida. Bc 344 u drugom i trećem roku berbe imao je viši sadržaj karotenoida u odnosu na prvi rok berbe (Grafikon 4.1.1.). Nadalje, Pajdaš je imao viši sadržaj karotenoida u trećem roku berbe u odnosu na drugi rok berbe. Karotenoidi se u zrnu kukuruza nakon fiziološke zrelosti ne mogu stvarati već se troše za zaštitu biljke od stresa, te rezultati kod hibrida Bc 344 i Pajdaš nisu očekivani. Uzrok tih rezultata su analize novih uzoraka za svaki rok berbe, te su pri novom uzorkovanju vjerojatno ubrani klipovi pod manjim utjecajem stresa (temperatura, padaline, plijesni) u odnosu na prethodno uzorkovanje. Kod hibrida Bc 353 i Bc 572, prema očekivanom, s odgodom roka berbe opada sadržaj ukupnih karotenoida. Ovi rezultati su u skladu s utvrđenom interakcijom roka berbe i sadržaja ukupnih karotenoida u zrnu kukuruza (Tablica 4.1.1.).

4.2. Antioksidacijska aktivnost zrna kukuruza

U Tablici 4.2.1. prikazan je utjecaj hibrida, roka berbe i njihove interakcije na ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna istraživanih hibrida.

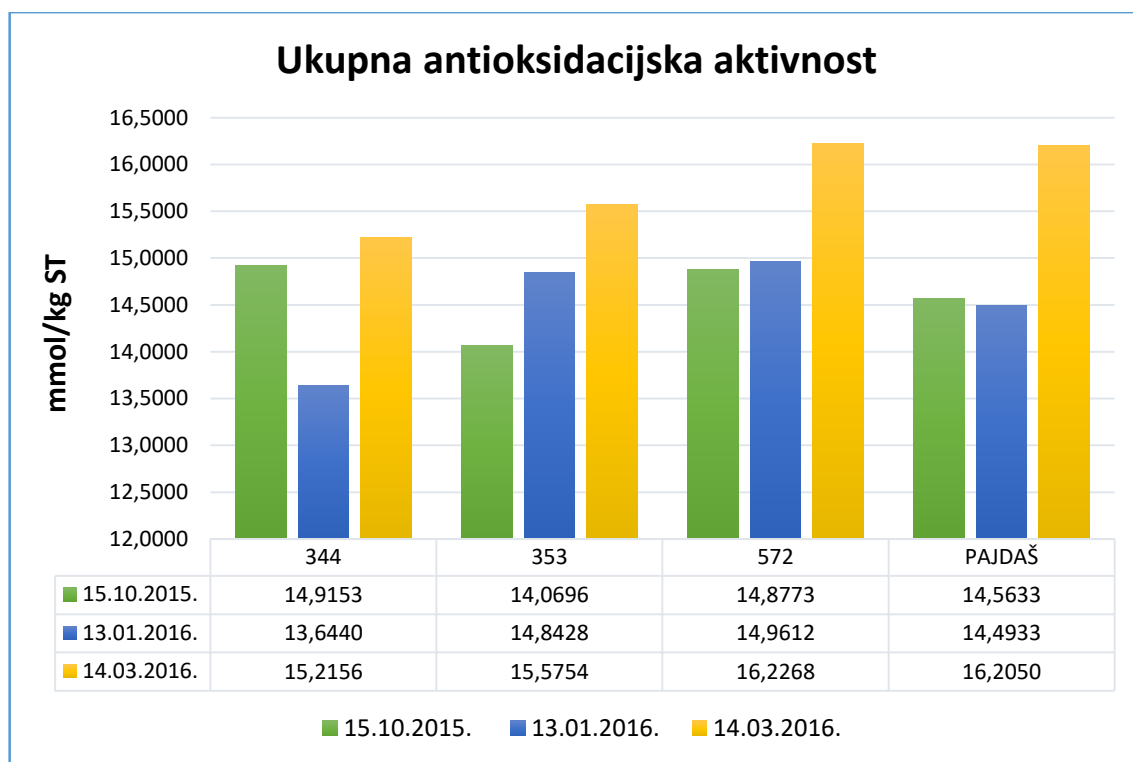
Tablica 4.2.1. Rezultati analize varijance ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna ispitivanih hibrida kukuruza tijekom prezimljavanja

	<i>Hibrid</i>	<i>Rok berbe</i>	<i>Hibrid × Rok berbe</i>
<i>df</i>	2	3	6
<i>F</i>	7,61	49,03	5,08
<i>Pr > F</i>	***	***	***

*Značajno za navedenu P vrijednost: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$*

Srednje vrijednosti ukupne antioksidacijske aktivnosti kod istraživanih hibrida tijekom prezimljavanja prikazuje Grafikon 4.2.1. Analizom podataka utvrđena je značajna razlika između hibrida u ostvarenoj prosječnoj antioksidacijskoj aktivnosti kroz sva tri roka berbe. Najviša vrijednost je zabilježena kod Bc 572 (15,36 mmol/kg), nešto niža kod Pajdaša (15,09 mmol/kg) i Bc 353 (14,83 mmol/kg) te najniža kod Bc 344 (14,59 mmol/kg). Također, hibridi se međusobno razlikuju i unutar istog roka berbe ($P < 0,001$). U prvom roku berbe, Bc 344 imao je najvišu vrijednost antioksidacijske aktivnosti, 14,92 mmol/kg, dok je u drugom i trećem roku berbe ostvario najnižu vrijednost antioksidacijske aktivnosti, 13,64 mmol/kg i 15,22 mmol/kg. Najvišu vrijednost antioksidacijske aktivnosti u drugom i trećem roku berbe ostvario je Bc 572, 14,96 mmol/kg i 16,23 mmol/kg (Grafikon 4.2.1.). Ovi rezultati u skladu su s utvrđenim utjecajem hibrida na antioksidacijsku aktivnost ($P < 0,001$), ali utvrđenom interakcijom hibrida i roka berbe ($P < 0,001$). Razlika u ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti između hibrida utvrđena je i u radu Alfieri i sur. (2014). Navedeni autori 2011. godine sijali su 17 talijanskih linija i 17 hibrida nastalih križanjem tih linija, te odabranih, najboljih iz prethodne godine, sedam linija i osam hibrida u 2012. godini. Utvrđena je viša antioksidacijska aktivnost linija i hibrida u 2012., vjerojatno zbog klimatskih razlika. U 2012. kukuruz je tijekom ljetnih mjeseci bio pod utjecajem stresa zbog suše. Nadalje, istraživani hibridi u ovom radu su imali više vrijednosti od vrijednosti kukuruza analiziranog u radu Serpen i sur. (2008) (~10 mmol/kg), ali niže od cijelog niza različito obojenih hibrida analiziranih u radu Žilić i sur. (2012) (15-35 mmol/kg).

Također, utvrđen je značajan utjecaj roka berbe na antioksidacijsku aktivnost zrna kukuruza ($P < 0,001$). Prosjek antioksidacijske aktivnosti zrna svih hibrida u prvom roku berbe iznosio je 14,61 mmol/kg, opada u drugom roku (14,49 mmol/kg), a najviša vrijednost od 15,81 mmol/kg zabilježena je u posljednjem roku berbe. Kod hibrida Bc 353 i Bc 572 vidljiv je porast antioksidacijske aktivnosti zrna s odgodom roka berbe, dok je kod Bc 344 i Pajdaš u drugom roku berbe zabilježen pad u odnosu na prvi rok (Grafikon 4.2.1.).



Grafikon 4.2.1. Ukupna antioksidacijska aktivnost zrna istraživanih hibrida kukuruza tijekom promatranog razdoblja prezimljavanja

Nadalje, može se uočiti da je od istraživanih hibrida Bc 344 u drugom i trećem roku berbe imao najviši sadržaj karotenoida i najnižu ukupnu antioksidacijsku aktivnost, dok je Bc 572 u trećem roku berbe imao najniži sadržaj karotenoida i najvišu ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Također, kod hibrida Bc 353 s odgodom roka berbe vidljiv je pad sadržaja karotenoida i porast ukupne antioksidacijske aktivnosti (Grafikon 4.1.1. i Grafikon 4.2.1.). Navedena opažanja upućuju da karotenoidi nisu jedini spojevi koji doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti zrna, što potvrđuje negativna korelacija između sadržaja karotenoida i ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna ($r = -0,38$; $P = 0,22$).

Prema Alfieri i sur. (2014) utjecaj karotenoida na ukupnu antioksidacijsku aktivnost manji je od 5%, isto je potvrđeno u radu Kljak i Grbeša (2015). Osim karotenoida kukuruz je bogat i drugim antioksidansima kao što je vitamin E te osobito fenolima i antocijaninima koji

više doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti, te ukupni sadržaj fenola pokazuje visoku povezanost s antioksidacijskom aktivnošću zrna kukuruza (Žilić i sur., 2012; Hu i Xu, 2011; Lopez-Martinez i sur. 2009,). Adom i Liu (2002) su utvrdili da antioksidacijska vrijednost vezanih fenola čini 85% ukupne antioksidacijske aktivnosti zrna kukuruza. Rezultati su dobiveni metodom određivanja kapaciteta neutralizacije oksiradikala, TOSC test (*eng. Total Oxyradical Scavenging Capacity*).

Nadalje, kako biljka proizvodi veće količine antioksidansa u obrani od stresa tijekom vegetativnog razdoblja, očekivan je pad antioksidacijske aktivnosti s odgodom roka berbe što je utvrđeno samo za drugi rok berbe. Rast antioksidacijske aktivnosti u trećemo roku berbe najvjerojatnije je rezultat otpuštanja vezanih fenola kao posljedica obrane zrna od mikroorganizama (Bakan i sur., 2003). Iako je ovaj rezultat posljedica negativnog djelovanja prezimljavanja, rast antioksidacijske aktivnosti ima pozitivan učinak na ljude i životinje koji će jesti taj kukuruz.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- Genotip ima značajan utjecaj na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna ispitivanih hibrida kukuruza,
- Zimski rokovi berbe značajno utječu na sadržaj karotenoida i ukupnu antioksidacijsku aktivnost zrna ispitivanih hibrida kukuruza,
- Zbog blage zime nije došlo do velikog pada sadržaja karotenoida i ukupne antioksidacijske aktivnosti.

6. Popis literature

1. Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187.
2. Alfieri, M., Hidalgo, A., Berardo, N., & Redaelli, R. (2014). Carotenoid composition and heterotic effect in selected Italian maize germplasm. *Journal of Cereal Science*, 59(2), 181-188.
3. Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
4. Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199-212.
5. Babić, V., Ivanović, M., & Babić, M. (2012). Nastanak i evolucija kukuruza i putevi uvođenja u naše krajeve. *Field & Vegetable Crops Research/Ratarstvo i povrtarstvo*, 49(1), 92-104.
6. Bacchetti, T., Masciangelo, S., Micheletti, A., & Ferretti, G. (2013). Carotenoids, phenolic compounds and antioxidant capacity of five local Italian corn (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 3(6), 137-141.
7. Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., & Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2826-2831.
8. Bauer, V., Sotnikova, R., Machova, J., Matyas, S., Pucovský, V., & Štefek, M. (1999). Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine, vessels and airways and the effect of antioxidants. *Life Sciences*, 65(18-19), 1909-1917.
9. Bc Institut, <<http://www.bc-institut.hr>>. Pristupljeno 14. ožujka. 2018.
10. Bendich, A. (1996). Antioxidant vitamins and human immune responses. *Vitamins and Hormones*, 52, 35-62.
11. Bendich, A. (1999). Immunological role of antioxidant vitamins. *Antioxidants in Human Health and Disease*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 4(2), 27-41.
12. Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 2(2), 419-444.
13. Berardo, N., Mazzinelli, G., Valoti, P., Lagana, P., & Redaelli, R. (2009). Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2378-2384.
14. Blessin, C. W., Brecher, J. D., & Dimler, R. J. (1963). Carotenoids of corn and sorghum. 5. Distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn. *Cereal Chemistry*, 40, 582-586.

15. Burt, A. J., Grainger, C. M., Smid, M. P., Shelp, B. J., & Lee, E. A. (2011a). Allele mining of exotic maize germplasm to enhance macular carotenoids. *Crop Science*, 51(3), 991-1004.
16. Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573.
17. Burton, G. W., Joyce, A., & Ingold, K. U. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221(1), 281-290.
18. Chander, S., Guo, Y. Q., Yang, X. H., Zhang, J., Lu, X. Q., Yan, J. B., and Li, J. S. (2008). Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(2), 223-233.
19. Chander, S., Meng, Y., Zhang, Y., Yan, J., & Li, J. (2008). Comparison of nutritional traits variability in selected eighty-seven inbreds from Chinese maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6506-6511.
20. Citizendium, <<http://en.citizendium.org>> . Pristupljeno 27.ožujka. 2018.
21. Colbert, L. B., & Decker, E. A. (1991). Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *Journal of Food Science*, 56(5), 1248-1250.
22. de la Parra, C., Serna Saldivar, S. O., & Liu, R. H. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177-4183.
23. DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711-738.
24. Egesel, C. O., Wong, J. C., Lambert, R. J., & Rocheford, T. R. (2003). Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Science*, 43(3), 818-823.
25. Egesel, C. O., Wong, J. C., Lambert, R. J., & Rocheford, T. R. (2003). Gene dosage effects on carotenoid concentration in maize grain. *Maydica*, 48(3), 183-190.
26. Encyclopedia Britannica, <<http://www.britannica.com>>. Pristupljeno 10.ožujka. 2018.
27. Esteban, R., Moran, J. F., Becerril, J. M., & García-Plazaola, J. I. (2015). Versatility of carotenoids: an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 63-75.
28. Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
29. FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014), Maize. <<http://www.fao.org>>. Pristupljeno 02. ožujka. 2018.
30. Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moel, G., Steghens, J. P., & Nabet, F. (1999). Les caroténoïdes: 1. Métabolisme et physiologie. In *Annales de Biologie Clinique*, 57(2), 169-183.
31. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265.

32. Frei, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), 1113-1118.
33. Fureš, I., Majerić, J., Obućina, P., & Tadić, M. (2017). Fizikalni pokazatelji oštećenja zrna kukuruza tijekom zimskih rokova berbe . Stručni projekt. Agronomski fakultet
34. Gey, K. F., Brubacher, G. B., & Stahelin, H. B. (1987). Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34(6), 137-141.
35. Gökmen, V., Serpen, A., & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science and Technology*, 20(6-7), 278-288.
36. Grbeša, D. (2008). Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja. Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja dd, Zagreb, Hrvatska.
37. Grbeša, D. (2012). Interna skripta, Kreпка-koncentrirana krmiva, Osnove hranidbe životinja
38. Grbeša, D. (2016). Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja. Bc Insitut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Hrvatska.
39. Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9(1), 1-32.
40. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
41. Halliwell, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54(6), 505.
42. Halliwell, B. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie and Biology* 44, 6–13
43. Halliwell, B. (1999). Food-derived antioxidants. Evaluating their importance in food and in vivo. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 43(2), 178-188
44. Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliгер, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
45. Harjes, C. E., Rocheford, T. R., Bai, L., Brutnell, T. P., Kandianis, C. B., Sowinski, S. G., & Yan, J. (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319(5861), 330-333.
46. Hencken, H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71(4), 711-717.
47. Howitt, C. A., & Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), 435-445.
48. Hu, Q. P., & Xu, J. G. (2011). Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 2026-2033.
49. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

50. Hulshof, P. J., Kosmeijer-Schuil, T., West, C. E., & Hollman, P. C. (2007). Quick screening of maize kernels for provitamin A content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(8), 655-661.
51. Ibrahim, K. E., & Juvik, J. A. (2009). Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoids and tocopherols in sweet corn and broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4636-4644.
52. Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15(5), 755-766.
53. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal Of Agriculture and Biology*, 11(1), 100-105.
54. Jialal, I., & Grundy, S. M. (1992). Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 33(6), 899-906.
55. Jurišić, M. (2008). *AgBase—Priručnik za uzgoj bilja, I. Tehnologija (agrotehnika) važnijih ratarskih kultura, VIP projekt, Studija MPŠVG, Osijek.*
56. Kljak, K. (2012). Antioksidacijska i pigmentacijska svojstva karotenoida iz zrna hibrida kukuruza u proizvodnji jaja. Doktorska dizartacija. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
57. Kljak, K., & Grbeša, D. (2015). Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids. *Food Chemistry*, 167, 402-408.
58. Kljak, K., Grbeša, D., & Karolyi, D. (2009). Procjena sadržaja karotenoida prema intenzitetu boje zrna kukuruza. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva*, 63(2), 93-110.
59. Krinsky, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 617-635.
60. Krinsky, N. I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual Review of Nutrition*, 13(1), 561-587.
61. Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88.
62. Kurilich, A. C., & Juvik, J. A. (1999). Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in Zea m ays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 1948-1955.
63. Lauer, J. (2004). Some Pros and Cons of Letting Corn Stand in the Field Through Winter. *Wisconsin Crop Manager*, 1(5), 75-79.

64. Li, P. X. P., Hardacre, A. K., Campanella, O. H., & Kirkpatrick, K. J. (1996). Determination of endosperm characteristics of 38 corn hybrids using the Stenvert Hardiness Test. *Cereal Chemistry (USA)*.
65. Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1187-1192.
66. Loskutova, E., Nolan, J., Howard, A., & Beatty, S. (2013). Macular pigment and its contribution to vision. *Nutrients*, 5(6), 1962-1969.
67. Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 1(6), 441-445.
68. Mahoney, K. J., Klapwyk, J. H., Stewart, G. A., Jay, W. S., & Hooker, D. C. (2015). Agronomic management strategies to reduce the yield loss associated with spring harvested corn in Ontario. *American Journal of Plant Sciences*, 6(02), 372.
69. Marusich, W. L., & Bauernfeind, J. C. (1981). Oxycarotenoids in poultry feeds. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, 319-462.
70. Menkir, A., Liu, W., White, W. S., Maziya-Dixon, B., & Rocheford, T. (2008). Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. *Food Chemistry*, 109(3), 521-529.
71. Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., & Kanter, M. (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(3), 312-319.
72. Mills, J. T., & Frydman, C. (1980). Mycoflora and condition of grains from overwintered fields in Manitoba, 1977-78'. *Can Plant Dis Surv*, 60, 1-7.
73. Mohammadkhani, N., & Heidari, R. (2007). Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22), 4022-4028.
74. Moussa, H. R., & Abdel-Aziz, S. M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1), 31-36.
75. Palozza, P. (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*, 56(9), 257-265.
76. Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184-187.
77. Palozza, P., Calviello, G., & Bartoli, G. M. (1995). Prooxidant activity of β -carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(6), 887-892.
78. Park, J. J., Smalley, E. B., & Chu, F. S. (1996). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1642-1648.

79. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.
80. Prior, R. L., & Cao, G. (2001). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. In *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*, 39-47.
81. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
82. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
83. Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
84. Robertson, A. E., Munkvold, G. P., & Hurburgh, C. R. (2010). Characteristics of Corn Left Standing Through Winter 2009-2010 in Iowa.
85. Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T., & Amaya-Farfan, J. (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6), 445-463.
86. Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.
87. Scott, C. E., & Eldridge, A. L. (2005). Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 551-559.
88. Senete, C. T., de Oliveira Guimaraes, P. E., Paes, M. C. D., & de Souza, J. C. (2011). Diallel analysis of maize inbred lines for carotenoids and grain yield. *Euphytica*, 182(3), 395.
89. Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., & Fogliano, V. (2008). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 816-820.
90. Shahidi, F. (1995). Phenolic compounds in fruits and vegetables. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*, 75-107.
91. Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food Nahrung*, 44(3), 158-163.
92. Shahidi, F. (Ed.). (1997). *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. The American Oil Chemists Society, 150-173.
93. Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
94. Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant Functions of Vitamins: Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669(1), 7-20.

95. Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
96. Stanner, S. A., Hughes, J., Kelly, C. N. M., & Buttriss, J. (2004). A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutrition*, 7(3), 407-422.
97. Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172-6181.
98. Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham: Nottingham University Press, 5-9.
99. Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers.
100. Thomison, P. R., Mullen, R. W., Lipps, P. E., Doerge, T., & Geyer, A. B. (2011). Corn response to harvest date as affected by plant population and hybrid. *Agronomy Journal*, 103(6), 1765-1772.
101. Thompson, K. H., & Godin, D. V. (1995). Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutrition Research*, 15(9), 1377-1410.
102. Truscott, T. G. (1990). New trends in photobiology: the photophysics and photochemistry of the carotenoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6(4), 359-371.
103. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160(1), 1-40.
104. Weber, E. J. (1987). Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(8), 1129-1134.
105. Wenzel, A. J., Fuld, K., & Stringham, J. M. (2003). Light exposure and macular pigment optical density. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(1), 306-309.
106. Woodall, A. A., Britton, G., & Jackson, M. J. (1996). Dietary supplementation with carotenoids: effects on α -tocopherol levels and susceptibility of tissues to oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 76(2), 307-317.
107. Woodall, A. A., Britton, G., & Jackson, M. J. (1997b). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1336(3), 575-586.
108. Wurtzel, E. T., Cuttriss, A., & Vallabhaneni, R. (2012). Maize provitamin A carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Frontiers in Plant Science*, 3, 29.
109. Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20-27.
110. Yuan, Y. V., & Kitts, D. D. (1997). Endogenous antioxidants: Role of antioxidant enzymes in biological systems. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, Champaign, Illinois: AOCS Press, 15, 258-270.

111. Žilić, S., Serpen, A., Akıllıoğlu, G., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1224-1231.